

化学发光微粒子免疫法和酶放大免疫法检测环孢素 A 全血浓度的相关性分析

陈秀云, 林秋雄, 何国东, 张梦珍, 王曦培, 侯兴华, 李汉平, 麦丽萍, 杨敏^{*} (广东省人民医院广东省医学科学院医学研究部, 广东省临床药理重点实验室, 广州 510080)

摘要: 目的 通过化学发光微粒子免疫法(CMIA)和酶放大免疫法(EMIT)检测环孢素 A 全血浓度, 评价 2 种方法检测结果的准确性和相关性。方法 CMIA 和 EMIT 检测低、中、高 3 个全血免疫抑制剂质控物, 进行准确度和批内、批间精密度的分析; 已知浓度的环孢素 A(49.5, 155.2, 395.8, 500.0, 995.0, 1 390.1 ng·mL⁻¹)加入到不含环孢素 A 全血样本中, 检测后计算结果回收率; 测定 100 份环孢素 A 患者全血样本, 测定值用 Deming 法进行线性回归分析和 Bland-Altman 法计算偏倚。结果 CMIA 低、中、高 3 个全血免疫抑制剂质控物准确度相对误差分别为 5.8%, 5.2%, 9.1%, 其批内和批间的变异系数分别为 7.4%, 6.9%, 8.6%和 10.1%, 11.3%, 8.7%, CMIA 回收率分别为 91%, 95%, 103%, 102%, 102%, 104%; EMIT 低、中、高 3 个全血免疫抑制剂质控物的相对误差分别为 2.8%, 2.3%, 4.3%, 其批内和批间的变异系数分别为 11.2%, 5.9%, 5.7%和 11.3%, 9.2%, 8.3%, EMIT 回收率分别为 90%, 92%, 97%, 98%, 99%, 102%; CMIA 和 EMIT 平均差异偏倚 21.7 ng·mL⁻¹(95% CI: -125.1~168.4 ng·mL⁻¹), EMIT 测定值/CMIA 测定值平均为 0.951(95% CI: 0.56~1.34), EMIT 测定结果平均低于 CMIA 5%左右。结论 CMIA 和 EMIT 检测环孢素 A 全血浓度符合免疫分析精密度的要求, 2 种方法的检测结果相关性好, 临床合理调整用药剂量时应考虑检测方法类型不同造成的影响。

关键词: 环孢素 A; 化学发光微粒子免疫法; 酶放大免疫法

中图分类号: R914.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)05-0558-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.009

引用本文: 陈秀云, 林秋雄, 何国东, 等. 化学发光微粒子免疫法和酶放大免疫法检测环孢素 A 全血浓度的相关性分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 558-562.

Correlation Analysis of Determination of Whole Blood Cyclosporin A Concentration by CMIA and EMIT

CHEN Xiuyun, LIN Qiuxiong, HE Guodong, ZHANG Mengzhen, WANG Xipei, HOU Xinghua, LI Hanping, MAI Liping, YANG Min^{*} (*Research Center of Medical Sciences, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology, Guangzhou 510080, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To assess the accuracy and correlation between chemiluminescent microparticle immunoassay(CMIA) and enzyme multiplied immunoassay technique(EMIT) in the determination of cyclosporine A(CSA) concentration in whole blood. **METHODS** The low, medium and high level of whole blood immunosuppressant control were determined by CMIA and EMIT, then the accuracy, intra-assay and inter-assay precision of each method were analyzed. The known concentrations of CSA(49.5, 155.2, 395.8, 500.0, 995.0 and 1 390.1 ng·mL⁻¹) were added into the whole blood sample without CSA and measured, then the recovery rates of testing results were calculated. Whole blood samples of 100 patients were detected, the results were analyzed by Deming regression for linear regression analysis and analyzed by Bland-Altman for calculating bias. **RESULTS** The relative error of the low, medium and high level of whole blood immunosuppressant control measured with CMIA was 5.8%, 5.2% and 9.1%, the intra-assay coefficient of variation(CV) was 7.4%, 6.9% and 8.6%, the inter-assay CV was 10.1%, 11.3% and 8.7%, and the recovery rate was 91%, 95%, 103%, 102%, 102% and 104%, respectively. While in EMIT, it was observed that the relative error was 2.8%, 2.3% and 4.3%, the intra-assay CV was 11.2%, 5.9% and 5.7%, the inter-assay CV was 11.3%, 9.2% and 8.3%, and the recovery rate was 90%, 92%, 97%, 98%, 99% and 102%, respectively. The bias of mean difference between CMIA and EMIT was 21.7 ng·mL⁻¹(95% CI: -125.1~168.4 ng·mL⁻¹). The relative value of EMIT/CMIA was 0.951(95% CI: 0.56~1.34). The determination results of EMIT was 5% lower than that of CMIA in average. **CONCLUSION** Determination of whole blood CSA concentration by CMIA and EMIT meet the requirement of accuracy in immune analysis. The results showed a good correlation between CMIA and EMIT. The effects of different types of detection methods should be taken into consideration for the rational dosage adjustment of drugs in clinic.

KEYWORDS: cyclosporine A; CMIA; EMIT

基金项目: 广州市科技计划项目(201509010012)

作者简介: 陈秀云, 女, 主管技师 Tel: 020-838278129(51159) E-mail: 634312210@qq.com ^{*}通信作者: 杨敏, 女, 硕士, 主任药师 Tel: (020)838278129-51159 E-mail: mnmyang@aliyun.com

环孢素 A 是一种真菌源性的环状十一氨基酸多肽,也是一种具有高选择性的强效免疫抑制剂^[1-3],许多研究证明了环孢素 A 在抵抗器官排斥方面的作用。研究表明免疫抑制是由 T 细胞受体介导的 IL-2 基因转录障碍造成的,环孢素 A 的治疗可以大大提高移植器官如心脏、肝脏和肾脏的存活率^[4-8]。但是环孢素 A 的治疗窗窄^[9-10],毒副反应较大,其血药浓度易受多种因素影响,包括食物、生理、病理、合并用药以及制剂因素等。故在临床应用中,应定期监测环孢素 A 血药浓度,及时调整给药方案,确保在安全剂量下的有效治疗。目前环孢素 A 血药浓度监测方法较多,主要有酶放大免疫法(EMIT)、放射免疫分析(RIA)、荧光偏振免疫分析法(FPIA)、高效液相色谱法(HPLC)、电化学发光法(Elecsys)、化学发光微粒子免疫法(CMIA)及液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)等^[11-13],CMIA 和 EMIT 目前临床应用广泛,可实现临床大批量标本的快速、高效检测。CMIA 以竞争法、夹心法等免疫测定方法为基础,采用微粒子化学发光技术,测量产生的化学发光反应;EMIT 的基本原理是半抗原与酶结合成酶标半抗原,与抗体结合后,酶活力大小与标本中的半抗原量呈一定的比例,采用分光光度法进行测量。为了研究 2 种不同分析方法对环孢素 A 血药浓度检测是否存在差异,该差异是否影响临床药物治疗浓度范围的使用,本实验室对两者进行了对比分析。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

ARCHITECT i1000_{SR}(美国雅培);syva 系统药物浓度检测仪(荷兰西门子);2 台仪器的配套试剂和定标液分别购自美国雅培(批号:72002M800,85K19816)和荷兰西门子(批号:6R079UL-K1,6R119UL-J2);全血免疫抑制剂质控物(伯乐,批号:21830);雷帕霉素/他克莫司/环孢霉素质控品(荷兰西门子,批号:3308)。

1.2 检测方法

CMIA 和 EMIT 分别运用 ARCHITECT i1000_{SR} 分析仪和 syva 系统药物浓度检测仪;CMIA 配套的定标液[包括 0(A),40(B),150(C),400(D),800(E)和 1500(F) ng·mL⁻¹ 6 个点]和 EMIT 配套的定标液(包括 0,50,100,200,350 和 500 ng·mL⁻¹ 6 个点)分别制定标准曲线;采用低、中、高 3 个水平的全血免疫抑制剂质控物,每个水平重复检

测 20 次,进行准确度分析;采用低、中、高 3 个水平的全血免疫抑制剂质控物,进行连续 5 d 的重复检测,每天分 2 个时间段(时间间隔>2 h),每个时间段连续检测 2 次,进行批内和批间精密度分析;已知浓度的环孢素 A(49.5,155.2,395.8,500.0,995.0,1 390.1 ng·mL⁻¹)加入到不含环孢素 A 全血样本中,每个浓度点前处理 4 个标本,每个标本检测 5 次,计算结果的回收率;收集 100 份环孢素 A 患者血样标本,检测后进行相关性分析。

1.3 环孢素 A 样品预处理

1.3.1 CMIA 样品预处理 在 1.5 mL EP 管中加入 200 μ L 充分混匀的样品,依次加入 100 μ L 裂解液和 400 μ L 沉淀剂,充分振荡 30 s 至变色,然后 14 000 r·min⁻¹ 离心 8 min,上清液倒入样品杯中上机检测。

1.3.2 EMIT 样品预处理 在 1.5 mL EP 管中加入 100 μ L 充分混匀的样品,再加 300 μ L 样品预处理液,用涡流混匀器充分混匀至少 10 s(以无碎块为准),混匀后静置 ≥ 2 min,14 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,将离心好的上清液尽量全部倒入符合仪器规格的试管中上机测试。检测结果超出仪器检测限,阴性全血作为稀释液。

2 结果

2.1 标准曲线

CMIA 根据浓度点和相对发光单位的数值(RLU),通过四参数 Logistic 曲线拟合(4PLC, Y-加权)数据约简法生成 1 条校准曲线;定标液 0(A),40(B),150(C),400(D),800(E)和 1 500(F) ng·mL⁻¹ 6 个点,每个点仪器自动重复 2 次检测,拟合曲线 RLU 分别为 431 231.2,322 818.6,246 332.2,179 153.1,132 082.1,93 014.3。EMIT 根据浓度点和吸光度数值,通过对数方程式生成 1 条校准曲线;定标液 0,50,100,200,350 和 500 ng·mL⁻¹ 6 个点,每个点仪器自动重复 2 次检测,平均吸光度分别为 0.260 3,0.275 2,0.287 4,0.307 2,0.323 6,0.334 6,标准曲线最大不准确值 1.17%。2 种方法对应的仪器接受并保存标准曲线,仪器自动对校准结果是否符合选定的有效性参数的规定值进行验证。校准没有超出规定值时,仪器不会出现错误信息,标准曲线合格,运行质控,质控值在实验室规定的范围内再进行标本检测。

2.2 2 种方法检测环孢素 A 血药浓度的准确度

由于真值无法直接获得,通常用靶值、参考

值或指定值作为真值使用。本实验采用了低、中、高 3 个全血免疫抑制剂质控物,通过测定其平均值与指定值比较,计算出相对误差(I),本实验准确度用相对误差表示,结果见表 1。 $I=(\text{测定值}-\text{指定值})/\text{指定值}\times 100\%$ 。

表 1 CMIA 和 EMIT 检测环孢素 A 血药浓度的准确度 ($n=20$)

Tab. 1 Concentration accuracy of cyclosporine A detected by CMIA and EMIT($n=20$)

项 目	CMIA			EMIT		
	低值	中值	高值	低值	中值	高值
指定值/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	109	208	441	75.9	182	307
相对误差/%	5.8	5.2	9.1	2.8	2.3	4.3

2.3 2 种方法检测环孢素 A 血药浓度的精密度
2 种方法的精密度用变异系数(CV)表示,结果见表 2。

表 2 CMIA 和 EMIT 检测环孢素 A 血药浓度的精密度 ($n=20$)

Tab. 2 Concentration precision of cyclosporine A detected by CMIA and EMIT($n=20$)

CV/%	CMIA			EMIT		
	低值	中值	高值	低值	中值	高值
批内	7.4	6.9	8.6	11.2	5.9	5.7
批间	10.1	11.3	8.7	11.3	9.2	8.3

2.4 回收率实验
回收率 $=(\text{检测浓度}\div\text{环孢素添加浓度})\times 100\%$,结果见表 3。

表 3 CMIA 和 EMIT 检测环孢素 A 血药浓度的回收率

Tab. 3 Recovery rates of cyclosporine A detected by CMIA and EMIT

已知浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均测量值/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		回收率/%	
	CMIA	EMIT	CMIA	EMIT
49.5	45.1	44.4	91	90
155.2	147.4	143.5	95	92
395.8	409.0	386.2	103	97
500.0	512.3	491.5	102	98
955.3	978.5	950.3	102	99
1 390.1	1 450.2	1 418.2	104	102

2.5 2 种方法检测环孢素 A 血药浓度的相关性分析
2 种方法分别检测 100 例环孢素 A 患者标本,样本范围 CMIA 为 $16.1\sim 1\,500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, EMIT 为 $4.6\sim 1\,216.4\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; CMIA 检测环孢素 A 平均浓度为 $(163.83\pm 235.56)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, EMIT 为 $(142.17\pm 169.14)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。2 种方法测定的结果用 Deming

法进行回归分析评价其相关性,以 EMIT 法测定值为 X , CMIA 法测定值为 Y ,回归方程为 $Y=1.399X-35.14$,截距(95%CI)为 $-45.8\sim -24.46$,斜率(95%CI)为 $1.351\sim 1.448$,相关系数 0.985,回归曲线图见图 1。用 Bland-Altman 法计算偏倚,2 种方法测定的偏倚程度见图 2,CMIA 和 EMIT 平均差异偏倚为 $21.7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (95% CI: $-125.1\sim 168.4\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),EMIT 测定值/CMIA 测定值平均为 0.951(95% CI: $0.56\sim 1.34$),EMIT 法测定结果平均低于 CMIA 5%左右。

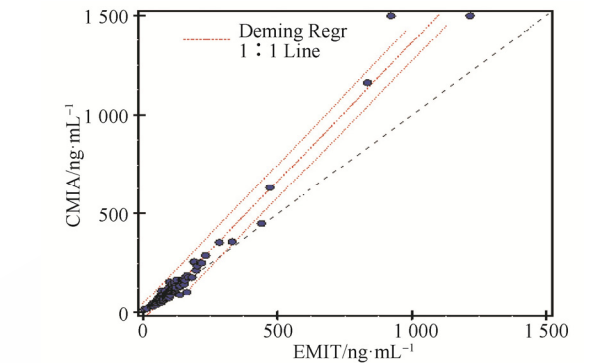


图 1 CMIA 与 EMIT 检测环孢素 A 的相关性
Fig. 1 Correlation of cyclosporine A detected by CMIA and EMIT

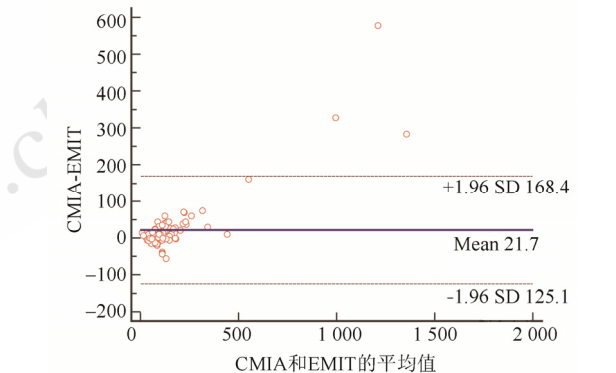


图 2 CMIA 与 EMIT 检测环孢素 A 的偏倚
Fig. 2 Bias of cyclosporine A detected by CMIA and EMIT

3 讨论
CMIA 和 EMIT 检测原理和校准曲线分析。
CMIA 采用两步法免疫检测,运用 Chemiflex 技术,样本中的环孢素 A 与环孢素 A 抗体包被的微粒子结合,再和吖啶酯标记的环孢素 A 结合物形成反应混合物,最后通过加入预激发液和激发液产生的化学发光反应以 RLU 来测量;EMIT 根据样本中的药物与重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶标的药物竞争抗体结合位点,再根据酶活性的变化使氧化

型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)转化成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)导致吸光度的改变来确定样本中的环孢素 A 浓度。2 种方法检测原理不同,标准曲线的校准方法也不一样。CMIA 通过四参数 Logistic 曲线拟合(4PLC, Y-加权)数据约简法生成一条校准曲线,每一个浓度点重复 2 次检测并规定了 RLU 范围, A 点、B 点、C 点、D 点、E 点和 F 点的 RLU 范围分别是<0.8, 31.6~47.1, 130.9~220.2, 255.3~511.8, 605.7~1 245.0 和 1 307.0~2 150.7 ng·mL⁻¹; B 点和 A 点 RLU 比值<0.86, F 点和 A 点 RLU 比值<0.24。EMIT 立方柱曲线最大不准确值为 1.17%,该值是对最大不准确性的一个衡量,用于吻合曲线,该值越低,就越能迫使曲线通过定标点,参考默认值为 2%。仪器接受并保存校准曲线后,评估校准情况时,必须将低、中、高值环孢素 A 质控品的预处理样本各检测 1 次,确保质控值在实验室规定的范围内,再运行样本的检测。

CMIA 和 EMIT 检测环境温度要求。CMIA 的环孢素 A 试剂从储存冰箱(4℃)取出可立即使用,仪器上最长储存 30 d,30 d 后必须丢弃;重新校准曲线可以延长试剂的最长在机稳定时间;在脱离仪器冷藏储存室后,微粒子试剂瓶未竖直向上放置,必须丢弃。EMIT 检测环境温度要求严格,温度过高会影响酶活性变化,试剂稳定性使用周期短;实验中的检测环境温度是(24±1)℃,湿度是 40%~60%,试剂开启后使用周期约 1 个半月。试剂出现可能变质的指征,质控值超出规定范围时,相关检测结果无效,需重新校准曲线和检测样本。

CMIA 和 EMIT 实验结果分析。从表 1 结果显示,2 种方法相对误差均<10%,准确性良好;准确度是指测定值接近真值的程度,合格测定值符合相对误差的绝对值≤15%。表 2 结果显示,CMIA 和 EMIT 批内和批间 CV<12%;参照卫生部临床检验中心室间质量评价标准,实验室内环孢素 A 批内和批间 CV 最佳参考范围值<12.5%。表 3 结果显示,回收率均>70%,符合药典分析定量要求。2 种方法批内和批间 CV 均符合实验室内的免疫分析精密度要求, CV 的误差应该属于系统和方法学误差。相关性分析结果显示,相关系数≥0.9, CMIA 和 EMIT 相关性好;由于样本量大小和样本群体差异等变量影响检测相关性,因此各个实验室检测

结果可能与这些数据存在差异。

环孢素 A 代谢产物对 CMIA 和 EMIT 检测结果的影响分析。监测环孢素 A 谷浓度时,药物在体内代谢后存在大量代谢产物,目前已知代谢产物 30 多种^[14-17];非特异性的免疫检测可与代谢产物如 AM1、AM1c、AM4N、AM9 和 AM19 等发生交叉反应;不同代谢产物,CMIA 和 EMIT 交叉反应率不同。资料显示,部分代谢产物存在免疫抑制活性,2 个主要活性代谢物 AM1 和 AM9 免疫抑制活性占母体作用的 10%~20%^[18-19];根据 2 种方法试剂说明书,在代谢产物 AM1 和 AM9 浓度 1 000 ng·mL⁻¹时, AM1 的 CMIA 和 EMIT 交叉反应率分别是 0.7%~1.7%和-5.9%; AM9 分别是-3.8%~1.9%和 5.5%;CMIA 交叉反应率比 EMIT 低。代谢产物发生交叉反应的非特异性及与方法学和抗体特异性的不同是产生偏倚的主要原因;实验数据显示,CMIA 检测结果普遍高于 EMIT,二者的平均浓度偏倚为 21.7 ng·mL⁻¹。另外,环孢素 A 检测过程中受可协同使用的药物及药物代谢物和内源性物质如胆红素、尿酸、胆固醇和总蛋白等的影响各不相同。如果环孢素 A 排泄受阻(如胆汁淤积)时,代谢产物可能积聚,从而影响检测结果,可以考虑使用特异性的检测方法(如液相色谱串联质谱法)^[20]。

不同检测方法测得环孢素 A 血药浓度水平不同,因此临床医师和临床药师在分析结果时应该注意检测方法,各实验室在发放检测结果时也应注明检测方法,有利于临床对结果进行分析,准确调整患者药物剂量。治疗浓度范围根据检测方法的不同而变化,每种检测方法应确立治疗范围。因检测方法及与代谢物交叉反应的差异性,不同方法的检测结果不能互换使用,也不能应用校正系数。因此,建议单个患者连续使用一种检测法。

REFERENCES

- [1] LI D Y, GE W H. Correlation study of *PXR 1792A>G* and *1944T>C* genotypes with the concentration/dose ratios of cyclosporine in renal transplantation subjects [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 97-100.
- [2] 王艳, 姬怀雪. 环孢素 A 血药浓度监测注意事项及用药指导[J]. *临床合理用药*, 2012, 5(32): 171-172.
- [3] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 第 17 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 691.
- [4] 王羽, 乔小云, 王璐璐, 等. 联合用药对环孢素 A 血浓度影

- 响的研究进展[J]. 医药导报, 2012, 31(7): 904-905.
- [5] 王欣晨, 商玉萍. 1236 例次再生障碍性贫血患者环孢素 A 血药浓度与其肝肾毒性的相关性研究[J]. 中国药师, 2017, 20(3): 513-515.
- [6] WANG S M, LI P F, ZHAO X L, et al. LC-MS/MS determination of cyclosporine in human blood and application in pharmacokinetics [J]. J Chin Mass Spect, 2010, 31(1): 53-58.
- [7] CHEN L, HE Q, RUAN J. Cyclosporine absorption profiling and therapeutic drug monitoring in stable renal allograft recipients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(5): 466-468.
- [8] 廖秀娟, 韦柳萍. 环孢素 A 的药动学及其影响因素研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 558-560.
- [9] JEBABLI N, KLOUZ A, BAHLOUS A, et al. Comparison of three methods for cyclosporine therapeutic monitoring [J]. Transplant Proc, 2007, 39(8): 2557-2559.
- [10] JULIA M. Potter pharmacoeconomics of therapeutic drug monitoring in transplantation [J]. Therapeut Drug Monitor, 2000, 22(4): 361.
- [11] 陈璐, 边原, 涂碎萍, 等. EMIT 法和 FPIA 法监测全血环孢素 A 浓度相关性比较[J]. 国外医药抗菌药物分册, 2017, 38(1): 41-43.
- [12] 王磊, 孙文利, 李培余, 等. 环孢素 A 血药浓度检测方法比较分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(3): 417-421.
- [13] WILLEMZE A J, CREMERS S C, SCHOEMAKER R C, et al. Cyclosporin kinetics in children after stem cell transplantation [J]. Br J Clin Pharmacol, 2008, 66(4): 539-545.
- [14] SCHULTZ K R, NEVILL T J, BALSHAW R F, et al. Effect of gastrointestinal inflammation and age on the pharmacokinetics of oral microemulsion cyclosporin A in the first month after bone marrow transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(5): 545-551.
- [15] GRIVEAS I, VISVARDIS G, PAPADOPOULOU D, et al. Effect of cyclosporine therapy with low doses of corticosteroids on idiopathic nephritic syndrome [J]. Artif Organs, 2010, 34(3): 234-237.
- [16] DUNCAN N, CRADDOCK C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(3): 169-174.
- [17] WILLEMZE A J, CREMERS S C, SCHOEMAKER R C, et al. Cyclosporin kinetics in children after stem cell transplantation [J]. Br J Clin Pharmacol, 2008, 66(4): 539-545.
- [18] VOLLENBROEKER B, KOEH J H, FOCKER M, et al. Determination of cyclosporine and its metabolites in blood via HPLC-MS and correlation to clinically important parameters [J]. Transplant Proc, 2005, 37(4): 1741-1744.
- [19] MAZA A, MONTAUDI H, SBIDIAN E, et al. Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011, 25(Suppl 2): 19-27.
- [20] WANG L, LIU H X, SUN W L. The application of HPLC-MS/MS method in the determination of whole blood concentration of Cyclosporine A and AM1 in bone marrow transplant patient [J]. Chongqing Med(重庆医学), 2017, 46(23): 3234-3237.

收稿日期: 2018-03-23

(本文责编: 沈倩)